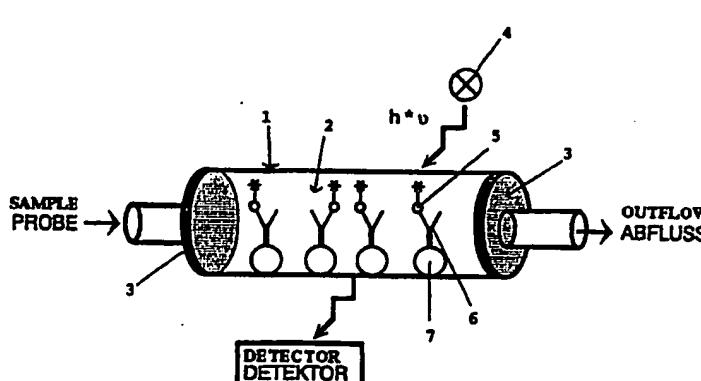


PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/00, 30/558		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/35121 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. November 1996 (07.11.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/00821 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. Mai 1996 (03.05.96)		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 195 16 179.3 3. Mai 1995 (03.05.95) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71)(72) Anmelder und Erfinder: CAMMANN, Karl [DE/DE]; Akazienallee 1, D-48155 Münster (DE). (74) Anwalt: BUTENSCHÖN-BERGMANN-REITZLE-NÖTH- GRAMBOW-KRAUS; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).			
(54) Title: SAMPLING DEVICE WITH INTEGRATED DOSIMETER AND FUNCTION DISPLAY AND SAMPLING PROCESS			
(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG ZUR PROBENNAHME MIT INTEGRIERTER DOSIMETER- UND FUNKTIONSANZEIGE UND VERFAHREN ZUR PROBENNAHME			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to a sampling device and a process for the selective collection, enrichment and separation of the materials and/or biological systems (analytes) to be determined from the sample matrix concerned, which permits not only the current functional indication of the state of charge but also a quantification of the analyte on dosimeter-like principles. This is achieved by the invention by specially analyte-selective collection phases on a receptor basis, the analyte binding sites of which are, however, saturated before every use with an easily detected "indicator substance". The latter is forced out of the binding sites of the receptor by the analytes to be detected and this can be immediately recognised by the naked eye if the indicator compounds are labelled with bright colours or fluorescence, and in other cases easily detected by means of internal or external sensors. This novel combination of a sampling device and dosimeter has considerable advantages over the prior art devices owing to the recognition of analyte ruptures which become obvious especially in trace analyses or the analysis for extremely dangerous substances.</p>			
			

BEST AVAILABLE COPY

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung richtet sich auf eine Probennahme-Vorrichtung und ein Verfahren zum selektiven Sammeln, Anreichern und Abtrennen der zu bestimmenden Stoffe und/oder biologischer Systeme (Analyte) von der betreffenden Probe-Matrix, das zusätzlich zu einer aktuellen Funktionsanzeige des Beladungszustandes eine Quantifizierung des Analyten nach dosimeterähnlichen Prinzipien ermöglicht. Dies wird erfahrungsgemäß durch besonders analyt-selektive Sammelphasen auf Rezeptor-Basis erreicht, deren Analyt-Bindungsstellen jedoch vor jedem Einsatz mit einer leicht feststellbaren sog. Indikationssubstanz abgesättigt sind. Letztere wird durch die zu bestimmenden Analyte aus den Bindungsstellen des Rezeptors verdrängt, was bei stark gefärbten oder fluoreszierenden Labeln der Indikationsverbindungen sofort mit bloßen Augen erkennbar ist, bei anderen mittels interner oder externer Sensoren leicht feststellbar ist. Diese neuartige Kombination von Probennahme-Vorrichtung und Dosimeter weist gegenüber den bisherigen Probennahme-Vorrichtungen wegen des Erkennens von Analyt-Durchbrüchen erhebliche Vorteile auf, die besonders bei Spurenanalysen oder der Analyse auf extrem gefährliche Substanzen augenfällig werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäß dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LJ	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estonien	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malkwi		

5

10

15 **mit integrierter Dosimeter- und Funktionsanzeige
und Verfahren zur Probennahme**

20 Die Erfindung richtet sich auf eine Probenahme-Vorrichtung und ein Verfahren zum Sammeln, Anreichern und Abtrennen der zu bestimmenden Stoffe oder komplexen biologischen und nicht-biologischen Systeme (= Analyte) von der Probenmatrix, die auf eine neuartige Weise gleichzeitig eine Funktionsprüfung verbunden mit einer Quantifizierung der zu bestimmenden Substanz(en) (Analyte) ermöglicht.

25

Die Nachfrage nach quantitativen Analysen komplexer Stoffgemische ist in den Bereichen Umweltanalytik und in der medizinischen Diagnostik wegen eines gestiegenen Umweltbewußtseins und großen Interesses an einer raschen und zuverlässigen medizinischen Diagnostik und Vorsorge stark angestiegen. Im Bereich der Umweltanalytik, aber auch auf dem Gebiet der biologischen und medizinischen Analytik wird die Qualität einer chemischen Analyse entscheidend von der Quali-

tät der Probenahme und der Probenvorbereitung im La-
bor geprägt. Vor allem auf dem Gebiet der Spurenana-
lyse müssen die Analyte, je nach der Nachweisgrenze
der jeweils verwendeten Analysenmethode, in vielen
5 Fällen vor der eigentlichen chemisch-analytischen
Bestimmung noch angereichert oder aufkonzentriert
werden. Bei diesem Vorgang sollten aber die nicht zu
bestimmenden (analysierenden) Bestandteile einer Pro-
be (= Probenmatrix) nicht mit angereichert werden, da
10 sie dann unter Umständen die eigentliche chemisch-
analytische Bestimmung der Analyte wegen einer nicht
mehr ausreichenden Selektivität der betreffenden Be-
stimmungsmethode stören können. Daher ist eine ein-
fache Aufkonzentrierung durch beispielsweise Ver-
15 dampfen (Einrotieren im Rotationsverdampfer) des Lö-
sungsmittels oder Auflösen der gesamten Gasprobe in
einer kleinen Lösungsmittelmenge (im Sinne einer Gas-
wäsche) nicht die optimale Lösung.

20 Optimal ist, wenn die Anreicherung auch mit einer
Abtrennung von unerwünschten Probenbestandteilen ver-
bunden ist. Für eine chemische Analyse von gasförmig-
en oder flüssigen Proben haben sich daher verschie-
dene Probenahmetechniken bewährt.

25 Bei gasförmigen Proben versucht man eine Anreicherung
der Analyte verbunden mit einer gleichzeitigen Ab-
trennung von der Hauptgasmenge dadurch zu erzielen,
daß man (wie in vielen DIN-Methoden beschrieben) das
30 Probegas durch mit einem speziellen Ab- oder Adsorp-
tionsmittel gefüllte Sammelröhrchen leitet, daß die
Analyte mit oder ohne eine chemische Veränderung (Ab-
fangreaktion) bevorzugt zurückhält und die Probenma-
trix ohne quantitative Ab- oder Adsorption oder chro-
35 matographischer Verzögerung passieren läßt. Zur

5 eigentlichen chemischen Analyse werden die so aufkonzentrierten und mehr oder weniger von der Matrix befreiten Analytmoleküle mittels geeigneter Maßnahmen von der betreffenden Sammelphase heruntergespült, wozu für diese Eluation minimale Mengen von Gas oder Flüssigkeit Anwendung finden sollen.

10 Die bekannten Gas-Sammelrörchen sind dazu, ähnlich wie im Falle einer gefüllten Chromatographie-Säule, mit einer sog. stationären Phase gefüllt, die die zu bestimmenden Stoffe (Analyte) besonders effektiv binden. Dazu werden dem derzeitigen Stand der Technik entsprechend bevorzugt Adsorptions- (Grundlage: Adsorptionsisothermen) oder Absorptionskräfte (Grundlage: Nernstscher Verteilungssatz) ausgenutzt. Beide Effekte sind leider nicht molekul- und damit analyt- spezifisch, sondern wirken bevorzugt über die bekannten schwachen Wechselwirkungskräfte (van der Waals, Dipol-Dipol, hydrophobe Wechselwirkungen, etc.), die 15 z.B. durch die Polarität eines Moleküls vorgegeben sind.

20 Bei gasförmigen Proben verwendet man dazu vorzugsweise die bekannten stationären Phasen der Gaschromatographie, die für die Analyte ein besonders ausgeprägtes Bindungsvermögen aufweisen, während die Probenmatrix-Bestandteile nur schwach gebunden werden. Eine mehr oder weniger analyt-selektive Bindung und damit quantitative Trennung von der Matrix kommt aber leider durch diese Adsorptions- oder Absorptionskräfte 25 (zwischen einer Gasphase und einem dünnen Flüssigkeitsfilm - analog den betreffenden Chromatographie-Arten) nicht zustande. Nach dem Stand der Technik werden in diesem Sammelrörchen oder Behältern 30 (Waschflaschen, Impinger oder dergl.) entweder gut 35

adsorbierende Stoffe, wie Aktivkohle, Silicagel, Aluminiumoxid, Mg-Silikate (Florasil), Zeolithe, Molekularsiebe o.ä. verwendet. Die Desorption der Analyte zur nachfolgenden Analyse erfolgt dann vorzugsweise bei erhöhter Temperatur (Thermodesorption). Eluens kann ein Gas oder auch eine Flüssigkeit mit guter Löslichkeit für die Analytmoleküle sein.

Bei flüssigen Proben nutzt man bevorzugt Verteilungsgleichgewichte aus. Daher werden hier die entsprechenden typischen stationären Phasen aus der Verteilungschromatographie (vergleiche: Autorenkollektiv (1981), Analytikum, VEB Deutscher Verlag für die Grundstoffindustrie, Leipzig), wie z.B. Carbowax 300, Squalan, Apizon, SE 30, SE 52, OV 17 oder auch bevorzugt das hochpolymere Tenax u.a. eingesetzt, die als dünner Flüssigkeitsfilm auf einem inerten, gekörnten Trägermaterial aufgezogen sind. Letzteres befindet sich als Sammelphase in der betreffenden Sammelvorrichtung.

Die Auswahl des für den Analyten am besten geeigneten Flüssigkeitsfilm und die Wahl des geeigneten Elutionsmittels richtet sich nach dem sog. Chromatographischen Dreieck, das dem Fachmann geläufig ist. Hier wird zunächst die Auswahl der stationären Sammelphase anhand maximaler Wechselwirkungskräfte (polare Analyte benötigen polare Sammelphase, unpolare entsprechend unpolare Phasen) getroffen.

Bei der Probenahme von flüssigen Proben hat sich anstelle einer Extraktion mit geeigneten Lösungsmitteln, die nachher zwecks Aufkonzentrierung wieder eingeengt und entsorgt werden müssen, in den letzten Jahren die sog. Festphasen-Extraktion (Solid Phase

Extraction, SPE) an festen, stationären Phasen, die der Flüssig-Chromatographie entliehen sind, zur Anreicherung und Zurückhaltung der Analyte und einer Matrix-Abtrennung sehr bewährt. Bei dem entsprechenden Sammeln von Analyten aus flüssigen Proben beruht die erfolgreichste Technik der sog. Festphasen-Extraktion auf einer Verteilung eines vorzugsweise lipophilen Analyten in einer entsprechenden Phase niedriger Polarität. Besonders geeignet zum Sammeln und Auf trennen wenig polarer Analytmoleküle sind sog. beispielsweise Reversed-Phase (RP)-Füllmaterialien (z.B. RP-12 oder RP-18).

Sowohl die Probenahme von Gasen als auch die von flüssigen Proben lässt sich aber erfindungsgemäß in Anlehnung an die Affinitäts-Chromatographie besonders vorteilhaft gestalten. Die Idee der vorliegenden Erfindung ist, daß man als Analyt-Sammelphase analyt-spezifische oder mindestens -selektive Rezeptoren (biologischer oder nichtbiologischer Art oder Herkunft) verwendet. Als selektiv analyt-bindende Rezeptoren sind alle Substanzen geeignet, die analog dem Prinzip der Antigen (= Analyt) - Antikörper Wechselwirkung (Schlüssel-Schloß-Prinzip oder "Induced-Fit" Handschuh-Prinzip) substanzerkennende Eigenschaften haben. Derzeit sind dazu weiter geeignet und auch bekannt:

Antigen-Antikörper-Ab-Fragmente, DNA-komplimentäre DNA (Prinzip der DNA-Sonden) oder analoge Systeme auf RNA Basis, Gast-Wirtsmoleküle der sog. supramolekularen Chemie, oder stationäre Trägermaterialien, in deren Oberfläche das oder die zu sammelnden Analyt-Molekülfomren nach der sog. "Molecular Imprinting Technik" eingeformt wurden, so daß dabei die jeweils zur Analyt-Molekülfomre komplimentäre Form dort als

Vertiefungen (Abdruck) auftreten.

Wegen der überaus großen Spezifität und sehr starken und selektiven Bindung von Analytmolekülen (z.B. Af-
5 finitätskonstante ca. $> 10^{10}$), erlaubt die Verwendung von analytmolekül-spezifischen Rezeptoren als Sammel-
phase wesentlich bessere Analyt-Isolierungen und -
Anreicherungen als alle anderen, bekannten Verfahren.

10 Bei der Sammlung aus gasförmigen Proben muß allerdings bei Verwendung biologischer Rezeptoren (Antikörper, Antikörper-Fragmente, DNA, RNA oder dergl.) eine gewisse Feuchtigkeit vorhanden sein, damit die Funktionsfähigkeit der betreffenden Proteinmoleküle
15 (Tertiär- und Quartär-Struktur) zur selektiven Analyt-Anbindung erhalten bleibt; daher ist in solchen Fällen eine Gaswäsche mit einer wässrigen oder partiell wässrigen Pufferlösung vorzuschalten. Bei flüssigen Proben braucht nur ein bestimmter pH-Wert und
20 eine bestimmte Ionenstärke eingehalten werden, damit die Proteinstruktur nicht denaturiert und damit die spezifische Analytbindungeigenschaft verloren geht.

25 In allen Fällen, d.h. sowohl bei den erstgenannten Sammelmaterialien auf Basis der Adsorption oder Ab-
sorption (Verteilung) wie auch bei den Sammelmateria-
lien auf Analyt-Rezeptor-Basis ist aber der jeweils aktuelle Beladungszustand (Grad der Absättigung mit Analytmolekülen) der betreffenden Sammelvorrichtung
30 und damit auch das sog. Analyt-Durchbruchsvolumen (verlustbringender, unkontrollierter Austritt aus der betreffenden Sammelvorrichtung wegen Überladung) der so gesammelten Probe zunächst unbekannt. Man muß zur Ermittlung dieses Probevolumens die maximal von der
35 Sammelvorrichtung zurückgehaltene Analytmenge jeweils

5 für jede Sammelvorrichtung einzeln ermitteln. Dies geschieht i.d.R. empirisch aus Versuchen mit synthetischen Standards. So erhält der Fachmann analytkonzentrations-abhängige, maximale Probenvolumina, bei denen der Analyt oder die Analyte noch zu 100 % in der Sammel- und Trennvorrichtung zurückgehalten werden.

10 Es ist im Sinne einer richtigen Spurenanalytik von zentraler Bedeutung, daß bei der Sammlung, Anreicherung und Matrix-Abtrennung des oder der Analyte eine Wiederfindungsrate von 100 % vorliegt. Das Durchbruchsvolumen kennzeichnet jene Probenmenge (Volumen an Probengas oder -flüssigkeit), die in einer vorgegebenen Zeit durch die Sammelvorrichtung geleitet werden dürfen, bevor die ersten Analytmoleküle wieder aus der Sammelvorrichtung austreten und daher für eine spätere Quantifizierung nicht mehr zur Verfügung stehen. Dies zieht Minderbefunde nach sich.

15 20 Das Durchbruchsvolumen ist aber zusätzlich auch von der Probenmatrix abhängig. Liegen mehr ähnlich gebaute Moleküle wie das Analytmolekül (oder -ion) in der Probenmatrix vor, so wird beispielsweise das Durchbruchsvolumen entscheidend verkleinert, weil die Sammelphase nur eine bestimmte, endliche Kapazität hat. Ähnlich können bei flüssigen Proben auch oberflächenaktive Substanzen in der Matrix wirken. Eine Erwärmung wirkt ebenfalls vermindernd auf das Durchbruchsvolumen. Wegen dieser starken Abhängigkeit von der individuellen Matrix der betreffenden Probe und der Sammelbedingungen, werden von erfahrenen Fachmännern i.d.R. besondere Vorsichtsmaßnahmen ergriffen, um einen Durchbruch (= Austritt aus der Sammel-Vorrichtung noch während der Sammelphase) des oder der

30

25

30

35

Analyte zu verhindern bzw. auszuschließen.

5 Zur Verhinderung einer sog. Überladung der Sammelphase in der jeweiligen Sammelvorrichtung und damit eines Durchbruchs des oder der Analyten und damit eines Verlustes schaltet man mindestens ein zweites Gas- oder Flüssigkeits-Sammelrörchen hinter dem ersten und bestimmt auch in dieser und allen weiteren so in Serie geschalteten Sammelvorrichtungen den oder die 10 Analyte und addiert diese Gehalte zu dem Wert, die mit dem Haupt-Sammel-System erhalten wurde.

15 Nach der Sammel- und Abtrennphase mit Anreicherung des oder der Analyten in der Sammelvorrichtung (Waschflaschen, Röhren, Kartuschen, Kapillaren o.ä.) wird bei gasförmigen Proben entweder der oder die Analyte durch Temperaturerhöhung (Thermodesorption) oder durch eine Extraktion mit wenig Lösungsmittel aus der Sammel-Vorrichtung gebracht und eine abgemessene 20 Menge chemisch analysiert. Bei der Festphasen-Extraktion von flüssigen Proben, wird das den Analyten am besten eluierende Lösungsmittel durch die Sammel-Vorrichtung geleitet und den oder die Analyte so der eigentlichen Analyse zugeführt. In beiden Fällen 25 ist natürlich die insgesamt durch die Sammelvorrichtung geflossene Probenmenge bekannt.

30 Da sowohl bei der oben erwähnten Gasprobennahme-Methode wie auch bei der für Flüssigkeiten, jegliche Überladung zu fehlerhaften Analysen führt, besteht das Problem letztere zu erkennen, um sicher zu gehen. Bei stark schwankenden Analyt-Konzentrationen und variierender Matrix, Temperatur und Probe-Sammelgeschwindigkeit können selbst die Hintereinanderreihung 35 mehrerer Sammelvorrichtungen nicht mehr ausreichen,

Großer Nachteil der letztgenannten, bisher ausschließlich praktizierten Methode ist der entsprechend vervielfachte Arbeitsaufwand und die starke Widerstandserhöhung für den Probenfluß durch mehrere hintereinander geschaltete Vorrichtungen. Da die eigentliche Sammelzone aus Gründen kurzer Diffusionswege der Analyte zu entsprechenden Bindungsstellen auf der Oberfläche des meist pulverförmigen Sammelmaterials relativ dicht gepackt (geschüttet) ist, wirkt diese Zone als starkes Strömungshindernis, d.h. es können sich dort, je nach Korngröße des Füll-, Träger- und Sammelmaterials, beträchtliche Druckverluste aufbauen.

Da man aber aus Gründen des Ausschließens von Einschleppungen von Verunreinigungen die Probenahmepumpe flußmäßig stets hinter den Sammelvorrichtungen platziert (Ansaugen der Probe), können so leicht Grenzen des Probendurchsatzes erreicht werden. Eine ist beispielsweise die, daß für eine vernünftige Probengeschwindigkeit ein derartig hohes Vakuum hinter der Sammelvorrichtung erzeugt werden muß, daß die betreffende Probenflüssigkeit zu sieden beginnt. Bei den proteinchemischen Sammelphasen auf Basis analyt-spezifischer biologischer Rezeptoren mit entsprechenden Analyt-Bindungsstellen kann das Problem der Protein-Denaturierung durch die verschiedensten Ursachen (Temperatur, Druck, pH-Wert, Ionenstärke, chaotrope Matrix, Schwermetalle o.a. Gifte, etc.) auftreten und zum Versagen der Sammelvorrichtung führen, ohne daß andere, äußere Anzeichen darauf hindeuten. Ein denaturiertes Protein hat alle Antigen (= Analyt) -bindenden Eigenschaften verloren, d.h. es liegt eine verfügbare Sammelkapazität von Null vor. Die betreffende Sammelvorrichtung ist dadurch zur Probenahme

ungeeignet geworden.

5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es auch, eine verbesserte Probenahme- und Sammelvorrichtung und ein damit auszuführendes Verfahren zu schaffen, das in der Lage ist, den jeweils aktuellen Analyt-Beladungs-(-belegungs) Zustand zu erfassen und eine einfache, automatische Funktionsprüfung einer Sammelvorrichtung für gasförmige und flüssige Proben zu ermöglichen, wobei gleichzeitig im Sinne einer qualitätsteigernden Probenahmetechnik darüber hinaus damit auch noch eine vorprobenartige Analyt-Quantifizierung durchgeführt werden kann.

10

15 Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die betreffenden, für den oder die Analyte optimale stationäre Sammelphase nicht - wie üblich - unbelegt, also mit freien Ad- oder Absorptionsplätzen, sondern erfindungsgemäß bereits mit einer allerdings schwächer ad- oder absorbierten oder rezeptor-gebundenen Verbindung (hier: Verdrängungssubstanz oder Indikationsverbindung oder -substanz genannt) belegt (gesättigt mit dieser zu verdrängenden Substanz) benutzt wird. Die von den zu sammelnden Analyten leicht zu 20 ersetzende Verdrängungssubstanz/Indikationsverbindung ist erfindungsgemäß geeignet markiert, so daß man anhand einer möglichst einfach zu erkennenden Markierungszone oder eines Integralsignals eines kleinen, nachgeschalteten, auf die durch den oder die Analyten 25 verdrängte, markierte Substanz ansprechenden Durchflußdetektors (oder interner und/oder externer Sensoren leicht feststellen kann, ob die zu sammelnden Analyte diesen Markierungsstoff bzw. diese Indikationsverbindung) schon vollständig aus dem aktiven 30 Sammelphasenbereich der Vorrichtung verdrängt haben

35

oder nicht, was einem zu vermeidenden Durchbruch mit den bekannten Nachteilen gleich käme. Das Integralsignal stellt die Aufsummierung aller Detektor- (Sensor) signale dar und entspricht der bekannten Gesamtmenge an Indikationsverbindung, die bis zum Zeitpunkt durch die Analyte verdrängt wurde. Da die Gesamt-Kapazität der Sammelphase an Analyt-Bindungsstellen bekannt ist, lässt sich so jede restliche Sammelkapazität ermitteln.

10

Die durch den Analyten zu verdrängende Indikationsverbindung besteht i.d.R. aus einem analytähnlichen Bindungsmolekül mit schlechter Anbindung an die Sammelphase als das oder die Analytmoleküle, welches aber zusätzlich kovalent mit einer geeigneten Markierung versehen ist oder eine intrinsisch enthält.

20

Die Art der Markierung dieser Indikationssubstanz ist erfindungsgemäß unerheblich. Besonders vorteilhaft sind allerdings solche, die mit bloßen Augen und/oder minimalen Hilfsmitteln, z.B. mittels einfacher interner oder externer Sensoren feststellbar sind.

25 30 35

Die Auswahl der optimal geeigneten markierten Verbindung, die im Verlauf der Probenahme durch die Analytmoleküle zu verdrängen ist, erfolgt bei den chromatographischen Sammelmaterialien anhand des chromatographischen Dreiecks, indem als zu verdrängendes Molekül eine Grundsubstanz verwendet wird, die unter den gegebenen Bedingungen kaum oder sehr schlecht auf einer entsprechenden adsorptions- oder verteilungschromatographischen Säule zurückgehalten wird. Handelt es sich beispielsweise bei der anzureichernden und zu sammelnden Analytmolekülsorte um eine besonders lipophile Verbindung, die bevorzugt von einer RP-Phase

festgehalten werden, so muß die markierte Verdrängungssubstanz weniger lipophil sein, was durch einen um den Faktor > 10 unterschiedlichen Ver- teilungskoeffizienten ausgedrückt werden kann. In 5 diesem Fall ist die Oberfläche der Sammelphase eben- falls lipophil (z.B. RP-18 Phase). Handelt es sich beispielsweise beim Analyten um eine hydrophile, polare Verbindung, so wird bevorzugt eine polare Sam- melphasenoberfläche zur Anreicherung und Abtrennung 10 des Analyten gewählt und eine weniger polare Markie- rungssubstanz zusammen mit einem ebenfalls weniger polaren Lösungsmittel verwendet.

Bei den neuartigen Sammelmaterialien auf Analyt-Re- 15 zeptor-Basis (z.B. immunchemische Bindung mittels Antikörper oder analytbindende Antikörperfragmente sowie Molecular-Imprinting Technik) eignet sich er- findungsgemäß das Analyt-Molekül selbst, wenn es bei- spielsweise kovalent an molekülmäßig größere Markie- 20 rungsatomgruppen (konjugierte Molekülgruppe mit ge- eigneten optischen, elektrochemischen oder anderen, zur Markierung geeigneter Eigenschaften) gebunden ist. In diesem Fall führt die sterische Hinderung 25 des so markierten Analyt-Moleküls zu einer kleineren Affinitätskonstante, was der erfindungsgemäß beab- sichtigten, weniger festen Anbindung (oder Assozia- 30 tion) an die Rezeptorphase entspricht.

Als geeignete Markierungsmoleküle oder -atomgruppie- 35 rungen haben sich in vielen eigenen Versuchsläufen besonders bewährt:
stabile Farbstoff-Moleküle mit besonders hohen, mole- kularen Extinktionskoeffizienten, fluoreszierende Mo- leküle mit starker Emissions-Intensität im sichtbaren Bereich des Spektrums, Redox-Systeme auf Basis von

Molekülen oder Ionen mit besonders hoher Standard-Austauschstromdichte, weiterhin:
elektrochemisch aktive (leicht ohne hohe Überspannung reduzier- oder oxidierbare Moleküle) sowie bestimmte
5 Ionophore, Enzyme, massenerhöhende Gruppen, DNA/RNA-Label oder dergl., wie sie von den Immuno-Assays oder DNA-Sonden her bekannt sind.

Bei molekülmäßig zu kleinen Markierungsgruppen, die
10 bei kovalenter Anbindung an das Analyt-Molekül die Affinitätskonstante zu wenig erniedrigen, so daß diese Indikationsverbindung zu schlecht von den Analyten verdrängt wird, kann man erfindungsgemäß auch ein dem Analytmolekül ähnliches mit einem zum betreffenden Rezeptormolekül passenden Epitop nehmen, wenn diese
15 markierte Verbindung dann eine hinreichend schwächere Bindung mit der Bindungsstelle des betreffenden Rezeptors eingeht. Hinreichend bedeutet erfindungsgemäß eine um den Faktor mindestens 2 kleinere Affinitätskonstante.
20

Bei den Sammelmaterialien auf Analyt-Rezeptor-Basis ist die Art des inerten Trägermaterials für die analyt erkennenden Rezeptormoleküle unerheblich. Wichtig
25 ist nur, daß das betreffende Trägermaterial packungsmäßig in den meist säulenartigen Sammelvorrichtungen nicht zu einem zu hohen Druckverlust führt.

Erfindungsgemäß kann man die Kapazität des Sammelraumes auch durch eine Kaskadenanordnung von mit entsprechenden, analytfangenden Rezeptormolekülen beladenen Filterpapieren oder probedurchlässigen Kunststoff-Folien mit entsprechenden größeren Durchmessern erhöhen. Stand der Technik auf dem Gebiet der inerten
30 Trägermaterialien für biologische und nicht biologi-
35

sche Rezeptoren sind poröse, druckstabile Träger (z.B. controlled pore glass, CPG, Kunststoff-Partikel oder solche auf anorganischer Basis, wie Silicagel o.ä.).

5

Wesentlich geringere Druckverluste treten in einer erfindungsgemäß mit einem aufgerollten planaren Träger (z.B. Filterpapier, Dialysierfolien, Cellophan- oder Kunststoffmembranen) gefüllten Probesammelvorrichtung auf.

10

Hier können die analyt-selektiven Rezeptormoleküle auf beiden Seiten des Trägers, der durch Abstandsvorrichtungen mit definierten Zwischenräumen operiert, immobilisiert werden. Entsprechende Anordnungen kennt der Fachmann aus dem Gebiet der Entsalzungsanlagen auf Basis der Umkehrosmose oder der Elektrodialyse. Durch die dadurch gegebenen kurzen Diffusionsstrecken der Analyt-Moleküle zu den betreffenden Bindungsstellen der Rezeptoren wird die Kinetik der Anbindung der Analyt-Moleküle an die betreffenden Bindungsstellen sehr beschleunigt.

20

Desweiteren können erfindungsgemäß als Sammelvorrichtung umfunktionierte dialysierschlauch-ähnliche Anordnungen (z.B. aus der Blutwäsche bei Nierenkranken stammend) benutzt werden, wenn die mit der Probe in Kontakt kommenden Oberflächen mit immobilisierten, analyt-bindenden Rezeptoren überzogen sind. Eine solche Anordnung kann beispielsweise weit über 100 receptorbeladene Schläuche mit Einzeldurchmessern unter einem Millimeter und Längen von über 10 cm enthalten. Die Probeströmung kann sowohl durch die Schläuche als auch um die Schläuche herum wie auch beim Vorliegen geeigneter Strömungs-Charakteristik beides zusammen

25

30

35

erfolgen. Wichtig ist eine Längsanströmung. Durch eine solche vorteilhafte Anordnung der Sammelphase wird eine große Beladungskapazität bei einem sehr geringen Druckverlust erreicht. Vorteilhafte Ausführungsformen bestehen aus durchsichtigen Materialien und lassen die zur einfachen optischen Erkennung notwendigen Wellenlängen durchtreten, was ein einfaches Erkennen des Beladungszustandes mit dem bloßen Auge ermöglicht. Die jeweils andere Oberfläche der Schläuche, die nicht mit der Probe in Kontakt ist, kann bei der Verwendung von Dialysierschläuchen ggfs. auch noch mit einer Lösung höherer Osmolarität gespült werden, so daß die zu sammelnden Analyt-Moleküle zusätzlich auch noch durch eine Strömung der Lösungsmittel-Moleküle in die Nähe der Bindungsstellen der Rezeptoren getrieben werden. Müssen niedermolekulare Analyte von hochmolekularen getrennt werden, dann werden die analytbindenden Rezeptoren vorteilhafterweise auf jener Seite der Dialysemembran immobilisiert, die nicht mit der Probe in Kontakt steht, weil so bei einem richtig gewählten molekularen Cut-off hierbei eine doppelt wirkende Abtrennung erzielt wird. Diese Probenahmetechnik ist besonders zur Gewinnung von Analyten aus biologischen oder medizinischen Proben geeignet.

Die richtige Orientierung der analyterkennenden Rezeptormoleküle ist die, bei der die spezifische Analyt-Bindungsstelle von der inerten Trägeroberfläche weg zeigt, da dann eine rasche und ungehinderte Bindung des zu sammelnden Analyten eintritt und so auch eine optimale Bindungsstellen-Dichte gegeben ist. Dazu werden in der Literatur zahlreiche Methoden beschrieben, die hier nicht Gegenstand der Erfindung und dem Fachmann geläufig sind.

Die rezeptorbelegten Sammel- und Kollektorphasen für die betreffenden Analyt-Moleküle werden beim erfindungsgemäßen Verfahren vor jedem neuen Einsatz der Analyt-Sammel- und Abtrennvorrichtung mit der Indikationsverbindung abgesättigt (überschußvermeidend beladen). Der Beladungsvorgang ist entweder an der direkt oder indirekt (z.B. Bestrahlen mit Licht geeigneter Wellenlänge bei Fluoreszenzmarkern), sichtbaren Anfärbung der Sammelzone oder bei undurchsichtigen Sammelvorrichtungen und/oder anderer Markierung durch den Durchbruch dieser Indikationsverbindung in den Durchflußdetektor feststellbar. Ebenso ist detektormäßig das Auswaschen eines Überschusses verfolgbar.

Da die so markierten Indikationssubstanzen im Laufe einer Probenahme sukzessive durch die sich anders verhaltenen Analyt-Moleküle aus der betreffenden Sammelzone verdrängt werden, ergibt sich so erfindungsgemäß eine vielfache und sofortige Kontrollmöglichkeit der jeweils noch vorhandenen Beladungskapazität der Probenahme- oder -Sammelvorrichtung. Damit wird ein bestehendes Problem der Spurenanalyse komplexer Proben besonders effektiv gelöst.

Bei konstanter und reproduzierbarer Packungsdichte der aktiven Sammelzone ergibt sich erfindungsgemäß vorzugsweise bei den besonders selektiv wirkenden Sammelmaterialien auf Rezeptor-Basis durch einfaches Abmessen der durch die zu sammelnden Analyt-Moleküle veränderten Markierungszone (Strecke) nach entsprechender Kalibrierung zusätzlich auch noch ein quantitativer Hinweis, der als Vorprobe dienen kann. Dieses Dosimeter-Verfahren kann darüber hinaus auch vorteilhaft zur Ermittlung der für die nachfolgende analytische Bestimmung optimaler Analytkonzentration her-

angezogen werden, was überflüssige, zusätzliche Bestimmungen erspart. Gleichzeitig wird durch die dadurch gegebene Redundanz der Ergebnisse die Zuverlässigkeit der betreffenden Analyse gesteigert.

5

Bei der erfindungsgemäß möglichen Verwendung von geeigneten Rezeptoren, die selektiv bestimmte Substanzklassen binden, ergibt sich darüber hinaus mittels einer derartigen neuen Sammelvorrichtung eine neue und besonders einfache und schnelle Methode zur zuverlässigen Bestimmung einer Vielzahl von entsprechenden Summenparametern. Es versteht sich für einen Fachmann von selbst, daß eine solche Sammelvorrichtung, die erfindungsgemäß mit einer auch als Dosimeter dienenden, Zustandsanzeige kombiniert ist, in den verschiedensten Einheiten, wie beispielsweise Masse oder Molarität kalibrierbar ist.

20

Die vorliegende Erfindung vereinigt dadurch die bekannten Techniken der Analyt-Anreicherung und Matrixabtrennung bei gasförmigen und flüssigen Proben mit einer neuen Technik der quantitativen Prüfröhrchen-Analyse auf Analyt-Rezeptor-Basis.

25

Im Fall eines Sammelmechanismusses auf chromatographischer Basis wird, nach dem derzeitigen Stand der Technik zu urteilen, keine Indikationssubstanz zur on-line Sichtkontrolle der Funktionsweise verwendet, die auch quantitative Abschätzungen der Analytkonzentration ermöglichen würde. Alle bisher in der Literatur beschriebenen Probesammelvorrichtungen schlagen die Hintereinanderschaltung derartiger Vorrichtungen zur Vermeidung von Analytverlusten vor. Ähnlich äußern sich auch alle standardisierten Verfahren (z.B. DIN-, EPA- u.a. Vorschriften).

30

35

Der Stand der Technik auf dem Gebiet der Prüfröhrchen oder Dosimeter ist bisher dadurch charakterisiert, daß mehr oder weniger selektive chemische Reaktionen des Analyten mit bestimmten Reagenzien ablaufen, die 5 aber i.d.R. zu einer irreversiblen Veränderung des Analyten führen. Dadurch sind derartige Vorrichtungen zur Probenahme, Probenanreicherung und Abtrennung von Analyten weniger geeignet. Dosimeter auf dieser Grundlage sind seit langem im Einsatz und lassen sich 10 i.d.R. nicht für weitere Messungen regenerieren.

Im Fall der erfindungsgemäßen Probenahmeverrichtung auf Analyt-Rezeptor-Basis, werden die Analyt-Moleküle unverändert und reversibel an die Rezeptormoleküle 15 gebunden oder assoziiert. Sie können danach durch bekannte, das Rezeptormolekül schonende Verfahren (pH-Wert Veränderung, chaotrope Reagenzien) wieder unverändert abgespalten und einer chemischen Analyse zugeführt werden. Charakteristisch für die vorliegende 20 Erfindung ist daher auch die Reversibilität der Sammelf-, Anreicherungs- und Abtrennmechanismen sowie die der Regenerierbarkeit der dadurch gegebenen Dosimeter.

25 Bekannt sind direkte on-line immunochemische Monitore auf der Grundlage der Verdrängung eines schwächer gebundenen fluoreszenz-markierten Antigens von einer affinitätschromatographischen Säule in Form einer entsprechenden Kartusche. Hier dient aber die Registrierung der aus der Kartusche austretenden fluoreszierenden Verbindung als direktes Analysensignal (Bestimmungssignal). In keinem Fall erfolgt die Quantifizierung durch das Abmessen einer Strecke der Sammelphase. Das optische Detektorsignal geht bei den 30 35 dem Fachmann bekannten Assay-Verfahren bei Erschöp-

fung des "Immuno-Reaktors" gegen Null, was schwer von dem Zustand bei geringen Analytspuren zu unterscheiden ist. Demgegenüber bleibt in einem solchen Fall bei der vorliegenden Erfindung die markierte Zone in der Sammelvorrichtung nahezu unverändert. Es ist aber trotzdem noch der aktuelle Beladungszustand sofort ablesbar.

Bekannt sind auch weitere direkte Bestimmungstechniken in miniaturisierter Kit-Form, bei denen ein markiertes Reagenz-Antigen nach entsprechender Verdrängung durch das Analyt-Antigen in einen eng benachbarten Reaktionsraum eindiffundiert und dort beispielsweise mit Hilfe zusätzlicher Reagenzien eine empfindliche Chemolumineszenz erzeugt, die direkt gemessen wird. Diese und alle weiteren Verfahren zur direkten Anzeige und Quantifizierung niedermolekularer Moleküle stellen direkte Bestimmungsverfahren auf immunochemischer Basis (Immunoassays) und keine Probennahmetechniken, bzw. keine Kombination von Probennahme mit Dosimetertechnik dar.

Die vorliegende Erfindung stellt in erster Linie eine optimierte und besonders vorteilhafte Probenvorbereitungstechnik dar, die die Sammlung der interessierenden Analyten mit ihrer Anreicherung und Abtrennung von der Probenmatrix verbindet und die die eigentliche hochgenaue Bestimmung des oder der Analyte mittels beliebiger Methoden gestattet. Dabei ist erfindungsgemäß die Art der Analyt-Anbindung durch sehr selektive immunochemische Bindungen oder mehr physikalisch-chemischer Adsorption oder Verteilung unerheblich. Wichtig ist erfindungsgemäß die Einfachheit der Markierung und ihre Feststellung und damit die zuverlässige Anzeige der jeweils (noch) vorhandenen

Analyt-Sammelkapazität, die in vielen Fällen auch noch gleichzeitig als Dosimeter dienen kann.

Wegen der großen Vielzahl der Kombinationsmöglichkeiten von stationären Sammelphasen mit den unterschiedlichsten strömenden Phasen ermöglicht die Erfindung eine nicht naheliegende Erweiterung aller bisher beschriebenen Immuno-Assay Techniken. Die Erfindung betrifft daher eine ideale Kombination von Probenahmetechniken mit Anreicherungs- und Abtrenntechniken, wobei je nach der vorher gewählten Selektivität der Sammelphase, nur ein einziger Analyt oder auch eine bestimmte Stoffklasse (Summenparameter-Bestimmung) gesammelt werden kann.

Die quantitative Gewinnung des so automatisch angereicherten und von der oft störenden Probenmatrix abgetrennten Analyten geschieht nach den bekannten Festphasenextraktionsmethoden, wobei die optische Verfolgung des Auswaschens des Restes der Indikationsverbindung die Extraktionseffektivität zu kontrollieren erlaubt; wenn sie nicht extrahiert wird. dann werden die gesammelten Analytmoleküle es erst recht nicht. Bei immunochemischen Methoden (affinitätskontrollierte Sammlung von einer Analytmolekülsorte oder mehrere Sorten) werden die bekannten Techniken der schonenden Antikörper-Antigen-Dissoziation, wie beispielsweise die Eluation mittels chaotoper Reagenzien (z.B. Harnstoff u.a.) oder einer sauren Pufferlösung (pH zwischen 1 bis 3) dazu verwendet. Die Menge an Elutionsmittel ist so bemessen, daß die Sammelphase dabei auch von der markierten Verbindung befreit wird.

Umfangreiche Tests im Vorfeld der Erfindung haben

ergeben, daß gut (richtige Orientierung) immobilisierte Affinitätsphasen viele dieser Regenerations-
schritte ohne wesentliche Einbuße an Funktionsfähig-
keit überstehen. Sie können durch erneute Beladung
unter optimalen Bindebedingungen (pH-Wert, Ionenstär-
ke etc.) mit dem markierten, zu verdrängenden Antigen
wieder beladen werden und zur nächsten Probenahme
verwendet werden. Auch bei dieser Beladung mit der
Indikationsverbindung (markierten Antigen) ist eine
leicht sichtbare Markierung von besonderem Vorteil,
denn man erkennt sofort den Beladungszustand und da-
mit den Zeitpunkt, wenn keine überschüssige Markie-
rungssubstanz beim Spülvorgang mehr aus der Sammelzo-
ne austritt.

Durch die freie Wahl einer optimalen Analysemethode
für den erfindungsgemäß abgetrennten und ange-
reicherten Analyten, ergeben sich bezüglich der ent-
scheidenden Analysen- und Bestimmungsmethode beson-
ders vorteilhafte Freiheitsgrade, die zusätzlich we-
gen der Abtrennung störender Beimengungen zu beson-
ders zuverlässigen und richtigen Analysenbefunden
führen.

Ein Einsatz dieser selbstkontrollierenden Analyt-Sam-
mel-Vorrichtung verbessert dadurch die Nachweisgren-
zen und Richtigkeit von Spurenanalysen in gasförmigen
und flüssigen Proben bei gleichzeitiger Vereinfachung
und Zeitersparnis. Die Erfindung stellt dadurch eine
entscheidende Weiterentwicklung aller bekannten, auf
eine Verdrängungsreaktion basierender Bio- oder Immu-
no-Assays dar, die demgegenüber keinerlei Bestim-
mungsmethodenfreiheit aufweisen.

Dementsprechend löst die Erfindung mehrere Probleme

der Spurenanalyse von gasförmigen und flüssigen Proben, die durch die bekannte Immuno-Assays und Prüfrohrtechniken allein nicht gelöst werden.

5 Mit der vorliegenden Erfindung werden die folgenden, besonders für die Spurenanalyse extrem bedeutsamen Vorteile erreicht:

- a) Der aktuelle Beladungszustand der betreffenden Sammelvorrichtung kann sofort erkannt werden, d.h. neu und frisch kann von dem Zustand alt, gebraucht oder noch analyt-beladen oder mit anderen Stoffen abgesättigt, auf Anhieb unterschieden werden.
- 10 b) Es ist erkennbar, ob in der Probematrix der zu analysierende Stoff überhaupt in nennenswerten Mengen vorhanden ist; denn wenn die Markierungszone sich nicht während des Durchleitens der Probe verändert, ist nichts vorhanden, was später zu analysieren wäre, was Analysenzeit, -kosten und Chemikalien-Abfall spart. Außerdem kann dadurch nahezu automatisch und in-situ und ohne Vorinformation über zu erwartende Analytkonzentrationen eine optimale Probenmenge gezogen werden.
- 15 c) Nach einer geeigneten Kalibrierung kann aus dem Abschnitt, bei dem die Indikationssubstanz durch den Analyten verdrängt wurde, die bis dahin gesammelte Menge ermittelt werden (Prüfröhrchen-Prinzip).
- 20 d) Es ist sofort feststellbar, wenn die Kapazität einer Probenahme-Vorrichtung dem Ende zugeht oder bereits überschritten wurde, was Analysenfehler verhindert.
- 25 e) Es werden keine weiteren Probenahmeverrichtungen in Serie benötigt, um das Durchbrennen zu ver-

hindern, was den Druckverlust in Grenzen hält und Arbeitszeit für die gesonderte Aufarbeitung erspart.

5 f) Die Sammel- und Abtrennvorrichtungen sind weiter miniaturisierbar und benötigen aus Sicherheitsgründen nicht eine so lange Durchfluß-Strecke der Sammelphase, sondern können wegen der Kontrollmöglichkeit mit vergrößerten, durchströmten Flächen arbeiten, was zu einem geringeren Druckverlust führt und weniger Pumpleistung erfordert.

10 g) Bei der Gewinnung der so gesammelten Analyten durch Eluation der so gleichzeitig von der Probenmatrix abgetrennten Analyte ist die Menge an Elutionsmittel, die zur verlustlosen Auswaschung der gesamten, gesammelten Analytmenge notwendig ist, diejenige, die auch die noch vorliegende Menge der markierten Verbindung aus der Probenahmeverrichtung verdrängt. Dies verhindert eine überflüssige Verdünnung.

15 h) Die Abmessungen der Sammelvorrichtung und damit auch ihre gesamte Sammelkapazität kann der nachfolgenden analytischen Bestimmungsmethode genau angepaßt werden, d.h., wenn durch das Verschwinden der markierten Sammelzone eine für die nachfolgende Bestimmung optimale Probemenge gesammelt wurde, kann der Sammeltorgang abgebrochen werden und die genaue Analytbestimmung beginnen.

20 i) Durch die analytkonzentrationsabhängige Probenahmezeit werden unnütze Sammelzeiten, die evtl. zu zu hohen Analytanreicherungen führen und wieder einen zusätzlichen Verdünnungsschritt vor der Bestimmung erfordern, vermieden.

25 j) Bei einer stöchiometrisch konstanten Verdrängung von leichter gebundenen, entsprechend markierten

30

35

Rezeptor-Partnern kann bei gefährlichen Analyten (z.B. Toxinen, Viren, Bakterien oder dergl.) auf eine zu starke Anreicherung und anschließende Elution verzichtet werden, wenn die Markierung 5 ein DNA/RNA-Label darstellt, das mit der bekannten PCR-Technik extrem empfindlich bestimmbar ist.

10 Ausführungsbeispiele der Erfindung werden in den Figuren 1 bis 7 erläutert.

15 In Fig. 1 ist eine besonders vorteilhafte, weil einfache optische Version der Erfindung schematisch dargestellt. Dazu ist ein Glas- oder Quarzrohr (UV-durchlässig) 1 mit der betreffenden analyt-optimierten Sammelphase 2 mit einem inerten Material 7, Rezeptoren 6 und Indikationssubstanz 5 unter Verwendung von zwei Fixierungselementen aus Glas- oder Quarzwolle oder entsprechenden Fritten 3 gefüllt. Bei Verwendung intensiv gefärbter geeigneter Indikationsstoffe 20 oder Antigen-Konjugaten mit besonders großen molekularen Extinktionskoeffizienten (wie z.B. Phophyrine, Carotinoide, Kristallviolett, etc.) kann anhand der entfärbten Zone in der Vorrichtung die jeweils noch aktuell vorhandene Sammelkapazität sofort abgelesen 25 werden. Nach entsprechender Kalibration ist dadurch auch die Dosis zusätzlich errechenbar.

30 Farbige, durch die Analytmoleküle zu verdrängende Antigene erhält man aus dem Analytmolekül selbst, indem es chemisch mit bekannten, stabilen und intensiv gefärbten Farbstoffen oder chromophoren Gruppen 35 kovalent verbunden wird. Es können aber auch dem Analyten ähnliche Moleküle mit eindeutig schwächerer Affinität zur Anreicherungsphase dazu verwendet wer-

den. Bei einer nicht immunochemischen Analytbindung kann durch eine geeignete Wahl der chemischen Eigenschaft der chromophoren oder fluorophoren Gruppe die Lipophilie des Markierungsmoleküls (Indikationssubstanz) eingestellt werden.

Aus Gründen der Empfindlichkeit sind alle bekannten, stabilen Fluoreszenzmarkierungen aus der Immuno-Assay oder Immuno-Sensor-Technik hier besonders gut geeignet. Die genaue Art spielt hier keine Rolle. Hierzu muß dann das Probenahmeröhrchen 1 mit der betreffenden, bekannten Anregungswellenlänge über eine Strahlungsquelle 4 beleuchtet werden. Vorteilhaft ist hier eine Fluoreszenz im sichtbaren Bereich des Lichtes, da dann die analyt-beladene, nicht-fluoreszierende Zone leicht und einfach zu erkennen ist.

Fig. 2 zeigt ein Ausführungsbeispiel mittels einer Detektoranzeige 8, die erfindungsgemäß dann angewandt werden kann, wenn die Probensammelvorrichtung für Licht undurchlässig ist oder wenn eine elektrochemische Markierung, wie beispielsweise Ferrocen, oder Moleküle mit einer chinoiden Struktur oder mit anderen gut zu reduzierenden oder oxidierenden Gruppen bzw. anderer Sensor-Markierung an das Analytmolekül gekoppelt ist. Hier ist zur Anzeige des Beladungszustandes und damit der Funktionsweise entweder an den inneren Gefäßwandungen des Sammelröhrchens ein die gesamte Sammelphase überstreichendes Elektrodenarray oder ein zusätzlicher externer Durchflußdetektor 8 erforderlich. Alternativ kann selbstverständlich an dieser Stelle auch ein entsprechender optischer Durchflußdetektor zur integralen Erfassung der verdrängten Markermoleküle verwendet werden.

Fig. 3 zeigt ein weiteres Ausführungsbeispiel mit einer weiteren Markierungsart. So können beispielsweise auch Enzyme als Marker für die zu verdrängenden Analytmolekül-Konjugat-Verbindung eingesetzt werden.

5 Hier muß allerdings vor dem Detektor über eine Zugabevorrichtung 9 ein entsprechendes Substrat, welches von der verdrängten enzymmarkierten Verbindung in ein detektionsfähiges Produkt umgewandelt wird, zugeführt werden. Besonders geeignet, da bereits wegen ihrer Verwendung bei entsprechenden Immuno-Assays kommerziell vorhanden, sind Analytmarkierungen mit beispielsweise Glucoseoxidase (GOD) oder alkalische Peroxidase (POD) oder Phosphatase, bei denen in Gegenwart dieser Enzyme (verdrängt von der Anreicherungs- und Sammelzone) aus den zuzusetzenden Substanzen Glucose, resp. Wasserstoffperoxid, resp. p-Aminobenzoylphosphat, elektrochemisch sehr gut anzuzeigende Verbindungen entstehen, die dem Durchschnittsfachmann geläufig sind.

10

15

20

Fig. 4 zeigt ein schematisiertes Ausführungsbeispiel für eine optimale in-situ Probenvorbereitung bei gasförmigen und flüssigen Proben. Bei gasförmigen Proben wird das zu untersuchende Gas vor dem Aufgeben auf die Sammelvorrichtung mittels eines sog. Scrubbers 10 (Gaswäscher) von den Analyten quantitativ befreit und letzterer in eine flüssige Phase überführt. Diese flüssige Phase kann aus einer wäbrigen Pufferlösung, aber auch - je nach Stabilität der Rezeptormoleküle - auch aus einem organischen Lösungsmittel bestehen.

25

30

Die die Analyte enthaltenden Flüssigkeiten werden dann durch die Sammelvorrichtung geleitet, wo eine Abtrennung und selektive Anreicherung der Analyte erfolgt.

Bei flüssigen Proben wird vorteilhafterweise dem Probenstrom durch eine immunochemische Sammelvorrichtung auch noch eine kleine Menge einer Pufferlösung mit hoher Pufferkapazität zugemischt. Der pH-Wert soll 5 dem, bei dem eine optimale Anbindung des Analyten an die betreffende Bindungsstelle stattfindet, entsprechen.

10 Fig. 5 zeigt ein Vorrichtungsbeispiel mit kaskadenartiger Anordnung der Sammelphasenträger, die auch zur gleichzeitigen Sammlung mehrerer Analyte eine unterschiedliche Selektivität haben können.

15 Fig. 6 zeigt ein weiteres Beispiel einer Sammelvorrichtung auf Basis der Dialyseschläuch-Anordnung mit parallelen Einzelschlüächen, was zu hohen Beladungskapazitäten führt.

20 Fig. 7 zeigt einen biologischen Anwendungsfall, bei dem der oder die Analyte so gefährlich sind, daß nur minimale Mengen davon gesammelt werden und jene auch in einer vor einer Spritze 11 aufzusetzenden Kartusche 12 mit selektiver Sammelphase verbleiben. Hier wird durch Ansaugen über die Nadel 13 die Probe über diese 25 rezeptorbeladene Phase geleitet, wodurch dann eine äquivalente Menge der harmlosen Indikationssubstanz 14 beim Zurückschieben des Spritzenkolbens für eine weitergehende Analyse freigesetzt wird. Besonders vorteilhaft ist in solchen Fällen eine Markierung 30 mittels DNA/RNA-Labeln, da dann die PCR-Technik zur Analyse dieser Spuren eingesetzt werden kann.

5 **Patentansprüche**

1. Vorrichtung zur Probenahme bei gasförmigen und flüssigen Proben zum Zwecke einer selektiven Anreicherung und Matrixabtrennung von zu bestimmenden Stoffen und/oder biologischen Systemen (Analyten) mit integrierter Dosimeter-Anzeige als Funktionsanzeige,
dadurch gekennzeichnet, daß der jeweils aktuelle Beladungszustand von analyt- und/oder stoffgruppen- oder biosystem-selektiven Sammelphasen mittels Markierung durch eine Indikationssubstanz feststellbar ist, in dem in der Verbindung die Verdrängung der Indikationssubstanz aus spezifischen Bindungsstellen der Sammelphasen durch die zu sammelnden Stoffe/Biosysteme als Dosimeter und zu ihrer Funktionsüberprüfung einsetzbar ist.
- 25 2. Vorrichtung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß in der markierten Sammelzone der Vorrichtung geometrische Formen verwirklicht sind, die eine Quantifizierung über eine Streckenskala oder ein Abzählen von von Indikationssubstanz-freien Zonen der Sammelböden (ohne Markierung) ermöglichen.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß die analyt-selektiven und markierten Sammel-
phasen auf inerte Träger immobilisiert sind, die
als körniges Schüttgut mit mittleren Durchmes-
sern im Mikrometermaßstab in lichtdurchlässigen,
röhren- oder schlauchförmigen oder rechteckigen
Durchström-Anordnungen einen minimalen Druckver-
lust ergeben und daß die durch Verdrängung der
Indikationssubstanz durch Analytmoleküle ent-
standene markierungsfreie Zone, die gut sichtbar
ist, eine schnelle und einfache, mit dem bloßen
Auge feststellbare Quantifizierung ermöglicht.
- 15 4. Vorrichtung nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß die inerten Träger für die analyt-selektiven
und markierten Sammelphasen durchlässige und
undurchlässige Folien sind, die entweder kaska-
denartig mit großem Querschnitt hintereinander
geschaltet senkrecht zu ihrer Oberfläche von der
Probe durchströmt werden oder die parallel zur
Oberfläche in einer aufgerollten Form, mit defi-
nierten Abstandshaltern versehen, mit der Probe
beaufschlagt werden, wobei eine oder beide Trä-
ger-Oberflächen mit der Sammelphase belegt sind.
- 25 5. Vorrichtung nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß bei kaskadenförmiger Anordnung der inerten
Träger, diese verschiedene, unterschiedliche
Analyte bindende Sammel-materialien enthalten
und dadurch eine Multi-Dosimeter-Anordnung aus-
gebildet ist.

6. Vorrichtung nach Anspruch 3,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die inerten Träger einzeln oder gebündelt
angeordnete, schlauch- oder röhrenförmige Mem-
branen oder Kapillaren sind, wobei die
Druckströmung mit der Probe beidseitig simultan
oder sequentiell, d.h. erst außen vorbei und
danach innen durch die Schläuche, Röhren, Kapil-
laren oder umgekehrt, erfolgt.
10
7. Vorrichtung nach Anspruch 6,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die schlauchförmigen Membranen Dialysier-
Anordnungen aus dem medizinischen Bereich sind,
die Sammelphasen nach den Methoden der gerichte-
ten kovalenten Anbindung auf die Oberflächen der
Dialysierschläuche immobilisiert sind und daß
durch einen zusätzlichen osmotischen Gradienten
über der Dialysiermembran ein gesteigerter Lö-
sungsmittelfluß senkrecht zur Membranoberfläche
erzeugbar ist, der die Analyt-Anbindungskinetik
unterstützt.
15
8. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 3,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die markierten und selektiv analyt-bindenden
Sammelphasen entweder den zu bestimmenden Stoff
selektiv binden oder eine zu bestimmende Stoff-
klasse bzw. das zu sammelnde biologische System
selektiv durch Bindung aus dem Probenstromquan-
titativ entfernen.
20
9. Vorrichtung nach Anspruch 3 oder 6,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß als markierte analyt-bindende Sammelphase
30
- 35

den zu sammelnden Stoffen entsprechende selektiv wirkende Rezeptoren in einer molekularen Orientierung mit zugänglichen Bindungsstellen auf den Trägeroberflächen immobilisiert sind.

5

10. Vorrichtung nach Anspruch 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die selektiv analyt-bindende Rezeptoren fol-
gende Molekül-Klassen oder Mischungen von ver-
schiedenen, zu einer Klasse gehörigen oder ver-
schiedenen Klassen angehörenden Rezeptoren um-
fassen:

15 a) immunologische Antikörper oder Antikörper-
Fragmente mit den zu sammelnden Stoffen
oder Biosystemen als Antigen;

b) komplimentäre DNA/RNA zu der, die es iso-
liert oder gebunden zu sammeln gilt (DNA-
Sonden-Prinzip);

c) supra-molekulare Wirts-Gast-Verbindungen;

20 d) durch "Molecular-Imprinting"-Technik gewon-
nene, selektiv die komplimentäre Analyt-
Molekülform-erkennende Oberflächen;

e) stationäre Phasen der Chromatographie;
wobei bei den Molekül-Klassen a) bis c) ein
25 nicht auf der Trägeroberfläche immobilisierter
Partner aus den Proben gesammelt wird.

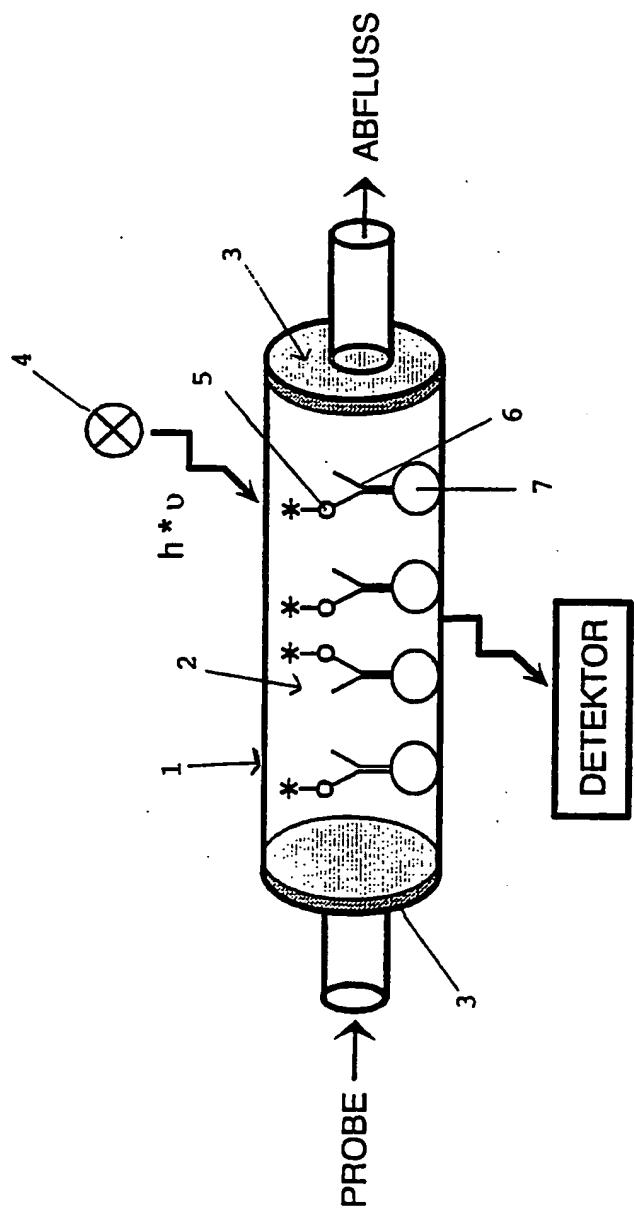
30 11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 und 10,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die Rezeptoren mit einer schwächer als der
Analyt gebundenen (assoziierten) und leicht di-
rekt optisch (mit bloßem Auge) oder mittels ein-
facher interner oder externer Sensoren anzeigba-
ren Indikationssubstanz als Markerverbindung
35 abgesättigt sind.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Indikationssubstanz ein dem oder der
Analytenstruktur formelmäßig oder physikalisch-
chemisch ähnliches Molekül enthält, das die Ei-
genschaft hat, von den zu sammelnden Stoffen
leicht aus der spezifischen Bindung und Assozia-
tion mit dem Rezeptor verdrängt zu werden und
direkt optisch oder indirekt mittels interner
oder externer Sensoren feststellbar ist.
10
13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Indikationssubstanz das Analytmolekül
oder die zu sammelnden Stoffe oder biochemischen
Systeme selbst, modifiziert durch eine Marker-
Atomgruppierung, enthält.
15
14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen Durchflußdetektor aufweist, der
über das Integral des Durchfluß-Signals von der
markierten, von den Analyten verdrängten Indika-
tionssubstanz den aktuellen Zustand der Sammel-
vorrichtung anzeigt und eine Summendosis angibt.
20
15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Quantifizierung der durch die zu sam-
melnden Stoffe verdrängten Indikationssubstanzen
mittels interner oder externer Sensoren auf op-
tischer, massensensitiver, kalorimetrischen oder
elektrochemischen Basis erfolgt.
25
30

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, durch gekennzeichnet, daß sie ein zur Probenströmung paralleles lineares Sensor-Array enthält, das auf einem angeschlossenen Rechner eine Zustands-Anzeige (Beladungsgrad) und Dosis-Quantifizierung ermöglicht.
5
17. Verfahren zur Probenahme bei gasförmigen und flüssigen Proben zum Zwecke einer Selektion Anreicherung und Matrixabtrennung mindestens eines Analysen kombiniert mit einer dosimeter-ähnlichen Quantifizierung.
10 durch gekennzeichnet, daß analyt- und/oder stoffgruppen- oder biosystem-selektive Sammelphasen vor jeder Probenahme mit mindestens einer stabilen und leicht feststellbaren Indikationssubstanz beladen werden, die während eines Sammeltorgangs von den zu sammelnden Stoffen/Biosystemen von der Oberfläche der Sammelphase verdrängt wird, wobei sich die Analyt-Dosis aus der Menge der analyt-verdrängten Indikationssubstanz (markierungsfreie Zone) ergibt, die durch eine Streckenmessung oder mittels eines integrierten Detektorsignals erfaßt wird.
15
- 20
- 25
18. Verfahren nach Anspruch 17, durch gekennzeichnet, daß die Analyte mittels eines Elutionsmittels aus der Probenahme-Vorrichtung entfernt und einer weiteren chemischen Analyse zugeführt werden.
30

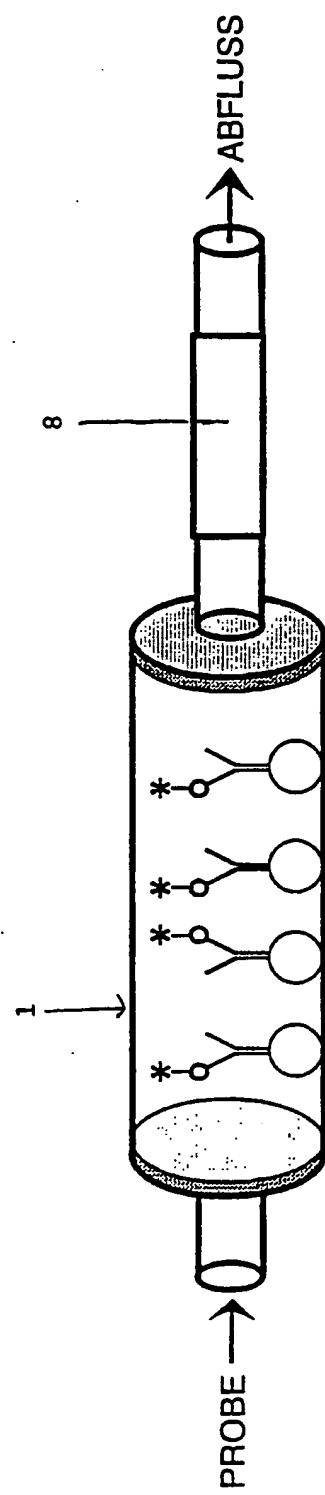
19. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß bei gefährlichen (toxischen) Analyten auf
5 eine zu große Anreicherung verzichtet wird, wozu
als zu verdrängende Indikationssubstanz ein
schwächer gebundener Partner des betreffenden
Rezeptors, der mit einem DNA/RNA-Label versehen
10 ist, gewählt wird und die vom Analyten freige-
setzte äquivalente Menge der so markierten In-
dikationssubstanz mittels extrem empfindlichen
PCR-Technik gemessen wird.
20. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß Hilfsreagenzien zur Feststellung des Ausma-
Bes der Markierungsverdrängung in den Proben-
oder Flüssigkeitsstrom eingespeist werden.
21. Verfahren nach den Ansprüchen 19 oder 20,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Vorrichtung in Form einer rezeptorge-
füllten Kartusche an einer medizinischen Nadel
oder Spritze positioniert wird und nach dem An-
saugen eines bestimmten Probevolumens die vor
25 dem darin enthaltenen Analyten verdrängten DNA/-
RNA-gelabelten Indikationssubstanz-Moleküle in
einen anderen Behälter zur weiteren PCR-basie-
renden Quantifizierung überspült werden.

FIG. 1



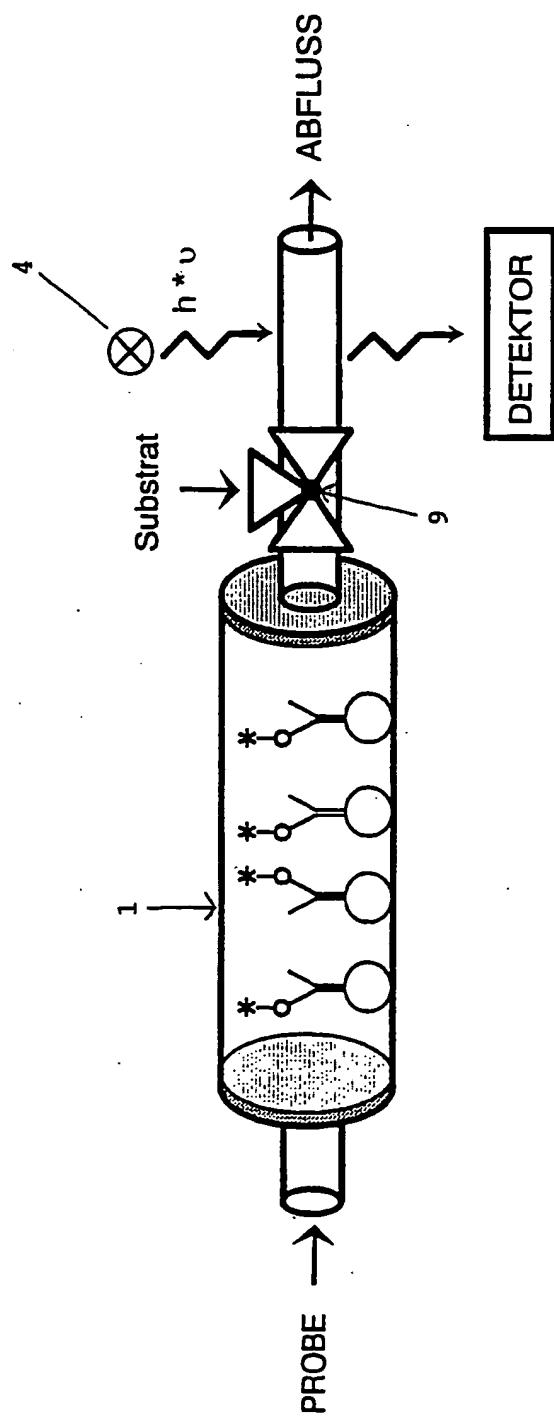
2/7

FIG. 2



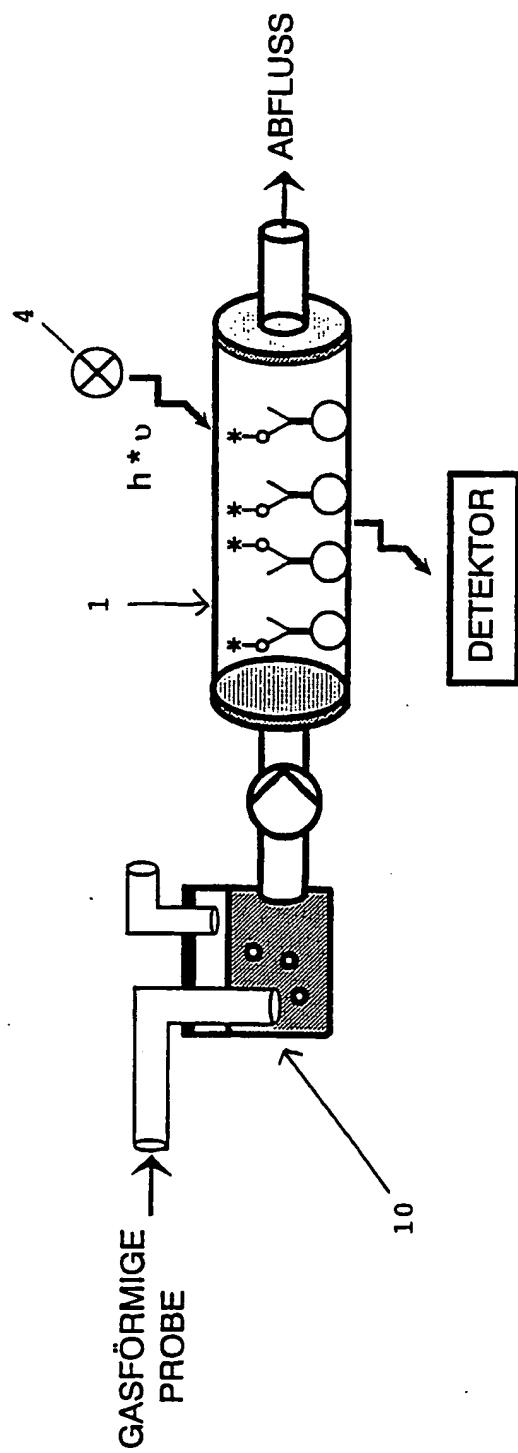
3/7

FIG. 3



4/7

FIG. 4



5/7

FIG. 5

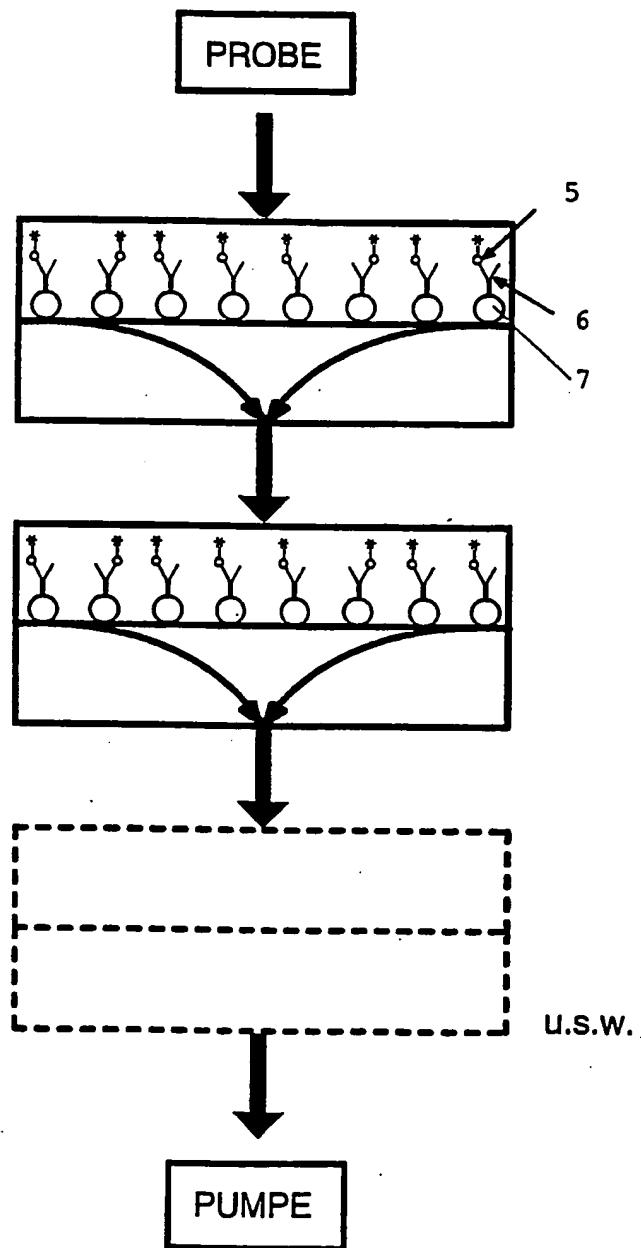
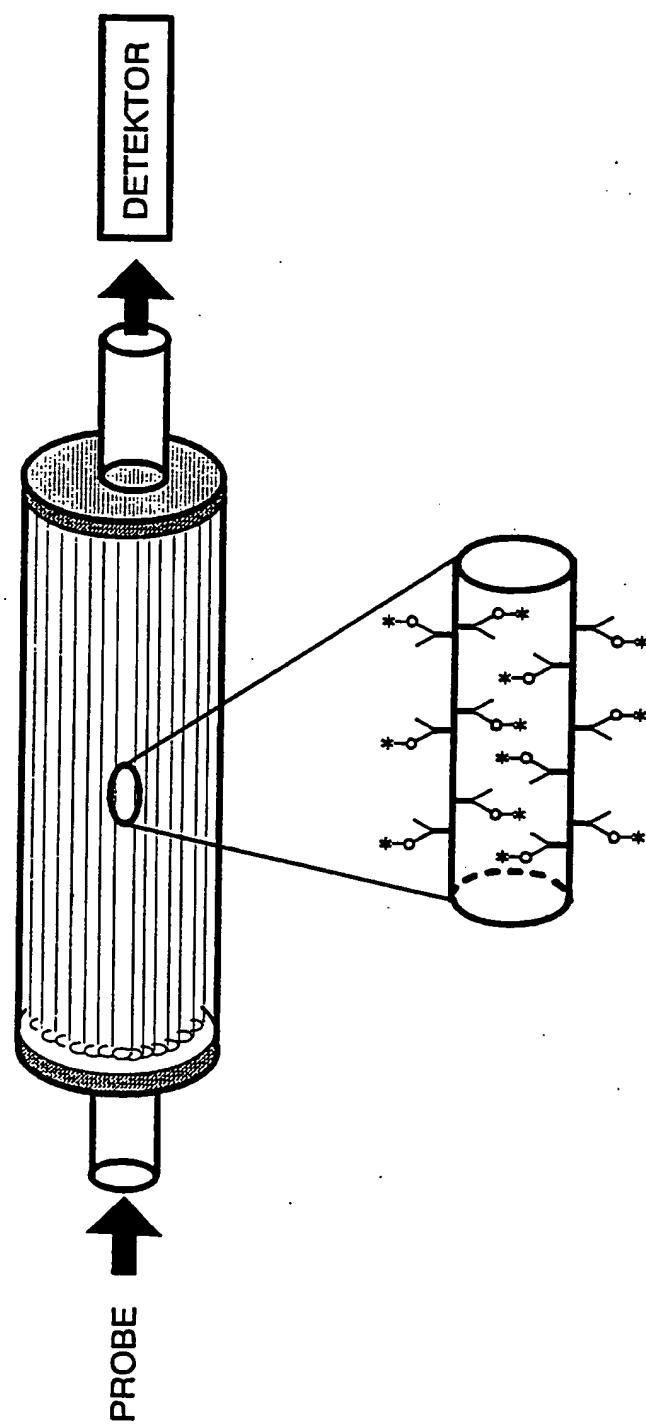
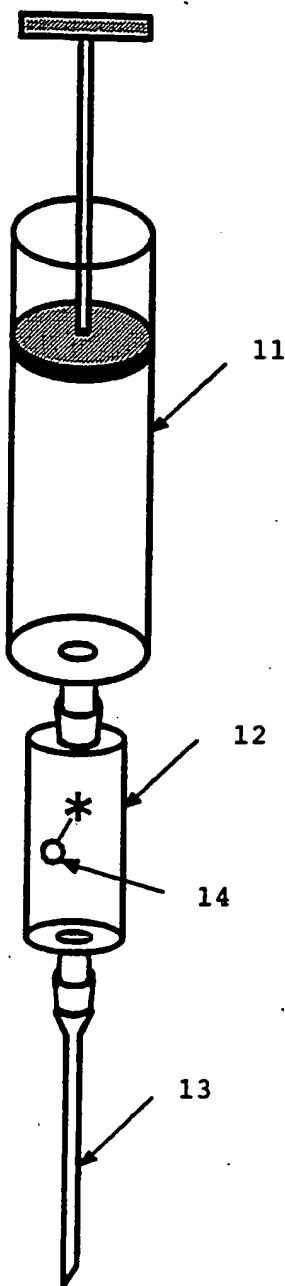


FIG. 6



7/7

FIG. 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 96/00821

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N30/00 G01N33/558

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 425 438 A (D. BAUMANN) 10 January 1984 see column 13, line 59-68 ---	1-3,8, 10-12, 14,15, 17,20
A	DE 27 20 073 A (RIEDEL-DE-HAAN) 9 November 1978 see page 3, paragraph 3 see page 4, paragraph 2 see page 7, paragraph 2-4 see page 8, paragraph 3-6 see page 10, paragraph 1 ---	1-3,8, 12,17
A	DE 26 09 869 A (KURT DANNHÄUSER) 15 September 1977 see page 4 - page 6, paragraph 1 ---	1
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- '&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

26 September 1996

16.10.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zinngrebe, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 96/00821

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 202 423 A (DRAEGERWERK AG) 26 November 1986 see column 3, line 32 - column 4, line 40 ---	1-3
A	EP 0 520 202 A (DRÄGERWERKE AG) 30 December 1992 see page 2, column 42 - page 4, column 10 ---	1
A	EP 0 560 411 A (UNILEVER NV) 15 September 1993 see page 8, line 10-43 ---	1
A	EP 0 648 532 A (ENGELHARD PROCESS CHEMICALS) 19 April 1995 see page 3, line 47-49 -----	1
		1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 96/00821

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US-A-4425438	10-01-84	AU-B-	560649	16-04-87
		AU-A-	8135482	16-09-82
		CA-A-	1184114	19-03-85
		EP-A-	0060700	22-09-82
		JP-C-	1778223	28-07-93
		JP-B-	4059586	22-09-92
		JP-A-	57161647	05-10-82
DE-A-2720073	09-11-78	NONE		
DE-A-2609869	15-09-77	NONE		
EP-A-202423	26-11-86	DE-U-	8510497	05-06-85
		JP-A-	61235751	21-10-86
EP-A-520202	30-12-92	DE-A-	4121493	07-01-93
EP-A-560411	15-09-93	AU-B-	626207	23-07-92
		AU-A-	1622888	02-12-88
		AU-A-	8048994	09-03-95
		AU-A-	8049094	09-03-95
		DE-D-	3887771	24-03-94
		DE-T-	3887771	26-05-94
		DE-U-	8805565	18-08-88
		EP-A-	0291194	17-11-88
		EP-A-	0560410	15-09-93
		ES-T-	2050704	01-06-94
		FR-A-	2614423	28-10-88
		WO-A-	8808534	03-11-88
		GB-A-	2204398	09-11-88
		HK-A-	140995	15-09-95
		JP-A-	6180320	28-06-94
		JP-A-	6160388	07-06-94
		JP-B-	7046107	17-05-95
		JP-T-	1503174	26-10-89
		AU-B-	656966	23-02-95
		AU-A-	1704992	27-08-92
		AU-B-	656967	23-02-95
		AU-A-	1705092	27-08-92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/DE 96/00821

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-648532	19-04-95	DE-A-	4424329	20-04-95
		JP-A-	7185317	25-07-95
		US-A-	5484454	16-01-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/00821

A. Klassifizierung des Anmeldungsgegenstandes
IPK 6 G01N30/00 G01N33/558

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 425 438 A (D. BAUMANN) 10.Januar 1984 siehe Spalte 13, Zeile 59-68 ---	1-3,8, 10-12, 14,15, 17,20
A	DE 27 20 073 A (RIEDEL-DE-HAAN) 9.November 1978 siehe Seite 3, Absatz 3 siehe Seite 4, Absatz 2 siehe Seite 7, Absatz 2-4 siehe Seite 8, Absatz 3-6 siehe Seite 10, Absatz 1 ---	1-3,8, 12,17
A	DE 26 09 869 A (KURT DANNHÄUSER) 15.September 1977 siehe Seite 4 - Seite 6, Absatz 1 ---	1
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *' A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *' E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *' L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie zugeführt)
- *' O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *' P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *' T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfundung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *' X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfundung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *' Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfundung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *' &' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Anmeldedatum des internationalen Rechercheberichts

26.September 1996

16.10.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Zinngrebe, U

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen
PCT/DE 96/00821

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 202 423 A (DRAEGERWERK AG) 26.November 1986 siehe Spalte 3, Zeile 32 - Spalte 4, Zeile 40 ---	1-3
A	EP 0 520 202 A (DRÄGERWERKE AG) 30.Dezember 1992 siehe Seite 2, Spalte 42 - Seite 4, Spalte 10 ---	1
A	EP 0 560 411 A (UNILEVER NV) 15.September 1993 siehe Seite 8, Zeile 10-43 ---	1
A	EP 0 648 532 A (ENGELHARD PROCESS CHEMICALS) 19.April 1995 siehe Seite 3, Zeile 47-49 -----	1

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/00821

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A-4425438	10-01-84	AU-B- 560649 AU-A- 8135482 CA-A- 1184114 EP-A- 0060700 JP-C- 1778223 JP-B- 4059586 JP-A- 57161647	16-04-87 16-09-82 19-03-85 22-09-82 28-07-93 22-09-92 05-10-82
DE-A-2720073	09-11-78	KEINE	
DE-A-2609869	15-09-77	KEINE	
EP-A-202423	26-11-86	DE-U- 8510497 JP-A- 61235751	05-06-85 21-10-86
EP-A-520202	30-12-92	DE-A- 4121493	07-01-93
EP-A-560411	15-09-93	AU-B- 626207 AU-A- 1622888 AU-A- 8048994 AU-A- 8049094 DE-D- 3887771 DE-T- 3887771 DE-U- 8805565 EP-A- 0291194 EP-A- 0560410 ES-T- 2050704 FR-A- 2614423 WO-A- 8808534 GB-A- 2204398 HK-A- 140995 JP-A- 6180320 JP-A- 6160388 JP-B- 7046107 JP-T- 1503174 AU-B- 656966 AU-A- 1704992 AU-B- 656967 AU-A- 1705092	23-07-92 02-12-88 09-03-95 09-03-95 24-03-94 26-05-94 18-08-88 17-11-88 15-09-93 01-06-94 28-10-88 03-11-88 09-11-88 15-09-95 28-06-94 07-06-94 17-05-95 26-10-89 23-02-95 27-08-92 23-02-95 27-08-92

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/00821

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-648532	19-04-95	DE-A- 4424329 JP-A- 7185317 US-A- 5484454	20-04-95 25-07-95 16-01-96
<hr/>			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.